

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

⑪ N° de publication :

2 443 867

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑲

N° 78 35329

⑤④ Procédé de séparation des protéines du lactosérum acide.

⑤① Classification internationale. (Int. Cl 2) B 01 D 15/04; A 23 J 1/20; C 07 G 7/00.

②② Date de dépôt 15 décembre 1978, à 14 h 9 mn.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 28 du 11-7-1980.

⑦① Déposant : Société dite : RHONE-POULENC INDUSTRIES, résidant en France.

⑦② Invention de : Bernard Mirabel.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Michelle Lepere, Rhône-Poulenc, Service Brevets Chimie et Polymères,
B.P. 753, 75360 Paris Cedex 08.

Best Available Copy

La présente invention a pour objet un procédé de séparation des protéines du lactosérum acide au moyen de résines échangeuses d'ions.

Il est connu, par la demande de brevet français n° 75.26530 du 28.8.75, que les protéines du lactosérum peuvent être séparées par mise en contact
5 du lactosérum avec des résines échangeuses d'anions.

En outre, on sait par la demande de certificat d'addition n° 76.22985 du 28.7.76, que la mise en contact du lactosérum avec une résine échangeuse de cations permet de séparer les immunoglobulines, les autres protéines restant en solution.

10 Cependant, ces séparations sont toujours effectuées sur du lactosérum doux, c'est-à-dire dont le pH est voisin de 7. Dans le cas des lactosérums acides, c'est-à-dire dont le pH est voisin de 4,6, il est nécessaire, pour effectuer la séparation des protéines suivant les procédés décrits, de modifier le pH par addition d'une solution alcaline, puis de filtrer pour
15 séparer les sels formés ; opérations qui sont toujours nuisibles aux protéines.

Inconvénients que ne présente pas le procédé de l'invention.

Le procédé de séparation des protéines, selon l'invention, consiste à mettre en contact du lactosérum avec une résine échangeuse de cations formée d'un support minéral poreux ayant une granulométrie comprise entre 4 μ m et
20 5 mm, une surface spécifique de l'ordre de 5 à 150 m²/g, un diamètre de pores de 500 à 2500 Å et un volume poreux de 0,4 à 2 ml/g, revêtu d'une quantité inférieure à 15 mg/m² d'un film de polymère réticulé contenant ou portant des groupements échangeurs de cations -SO₃H ou -COOH et possédant une capacité d'échange inférieure à 2 meq./g, à adsorber les protéines, puis à les éluer
25 et est caractérisé en ce que le lactosérum mis en oeuvre est acide et en ce que toutes les protéines sont séparées.

Par lactosérums acides on entend les sous-produits de la fabrication de la caséine et de la fabrication des fromages à pâte fraîche ou à pâte molle, caractérisés par un pH inférieur à 5,5, une teneur en sels minéraux
30 relativement élevée et une teneur en protéines : lactalbumines, séralbumine, lactoglobulines, immunoglobulines, généralement comprise entre 5 et 7 g/l ; ainsi que les perméats d'ultrafiltration, lactosérums ayant déjà subi une déprotéination par ultrafiltration, caractérisés par un pH inférieur à 5,5, une teneur en matières grasses très faible, et une teneur en protéines
35 inférieure ou égale à 0,6 g/l.

Comme support minéral poreux, on met en oeuvre des oxydes métalliques, tels que : oxyde de titane ou aluminés, et plus particulièrement des silices.

Les polymères réticulés qui revêtent la surface du support sont des produits en eux-mêmes connus, obtenus à partir de monomères, tels que le
40 formaldéhyde qui réticule par polycondensation avec les phénols ; les monomères

res vinyliques, comme par exemple le styrène et ses dérivés, les acides acrylique, méthacrylique, vinylbenzoïque, qui réticulent avec des monomères polyfonctionnels comme les diacrylates ou diméthacrylates de mono- ou poly-alkylèneglycols; le divinylbenzène, les vinyltrialcoxysilanes, les vinyl-trihalogénosilanes, le bis-méthylène acrylamide, en présence d'un initiateur ou de rayons ultraviolets.

Le revêtement du support minéral par le polymère réticulé est obtenu par imprégnation du support avec une solution du ou des monomères et éventuellement de l'initiateur dans un solvant qui est ensuite évaporé et les monomères réticulés selon les procédés connus. Un procédé particulièrement adapté au revêtement de supports a été décrit dans la demande de brevet français n° 76.22985 du 28.7.76.

La mise en contact du lactosérum avec la résine échangeuse de cations se fait sans modification du pH du lactosérum acide, et généralement à un pH inférieur à 5,5 et à une température comprise entre 0 et 60°C.

La quantité de résine échangeuse de cations à mettre en oeuvre est de l'ordre de 5 à 20 g/g de protéines à séparer. Après mise en contact, les protéines sont adsorbées sur la résine échangeuse de cations et la solution restant est totalement déprotéinée. Cette solution peut être valorisée par application de traitements classiques, tels que : cristallisation du lactose, fermentations de levures ou de champignons filamenteux, etc...

La séparation des protéines adsorbées de la résine échangeuse de cations est obtenue par élution avec soit une solution de force ionique élevée, soit une solution de pH basique, comme par exemple une solution d'hydroxydes alcalins, tels que ammoniacque, soude ou potasse. Des éluitions successives d'une même résine avec des solutions basiques, mais de concentrations différentes peuvent permettre d'obtenir la séparation de deux protéines ou des protéines et d'impuretés adsorbées sur la même résine.

La séparation des protéines du lactosérum peut être effectuée avec des résultats identiques en discontinu, en semi-continu en colonne, ou en continu avec des séries de colonnes. Les opérations en continu sont particulièrement adaptées aux réalisations industrielles, les résines échangeuses de cations permettant un remplissage facile des colonnes, un grand débit et une facilité d'élution.

Les solutions de protéines obtenues ne contiennent plus que des traces de matières grasses, de lactose et de sels minéraux. Elles peuvent être utilisées telles quelles, ou bien les protéines peuvent être séchées par toutes techniques connues et plus particulièrement par atomisation ou par lyophilisation.

Les protéines séchées se présentent sous forme de poudres blanches

ou très faiblement colorées, de pureté élevée. Elles ne sont pas dénaturées.

Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre dans les fromageries pour la préparation de protéines, particulièrement aptes à être utilisées dans les industries alimentaire, diététique, pharmaceutique et vétérinaire.

5 On donne, ci-après, à titre indicatif et non limitatif, des exemples de réalisation de l'invention.

Exemple 1

10 Dans une colonne de 2,5 cm de diamètre, sont placés 10 g d'une résine échangeuse de cations, constituée d'une silice ayant une granulométrie de 100 à 200 μ m, une surface spécifique de 37 m²/g, un diamètre poreux moyen de 1200 Å et un volume poreux de 0,95 ml/g, revêtue de 2,8 mg/m² d'un copolymère styrène-vinyltriéthoxysilane portant des groupements fonctionnels -SO₃H et présentant les caractéristiques suivantes :

- 15
- taux de carbone 4 %
 - taux de soufre 1,4 %
 - capacité d'échange 0,43 meq./g

La résine est lavée successivement par passage de 100 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N en une heure, puis de 200 ml d'eau en 2 heures.

20 200 ml de lactosérum acide, dont le pH est de 4,6 et la teneur en protéines de 5,2 g/l, sont percolés à température ambiante dans la colonne, à raison de 100 ml/h, puis la résine est lavée par passage de 100 ml d'eau.

Les solutions sortant de la colonne contiennent les matières grasses, le lactose et les sels minéraux présents dans la solution de départ et ne contiennent plus de protéines.

25 Les protéines adsorbées sur la résine : α -lactalbumines, β -lactoglobulines, sérumalbumine, immunoglobulines, sont éluées par percolation de 35 ml d'une solution d'ammoniacale N/10. Après concentration sous vide et séchage par lyophilisation, on obtient 1,2 g d'une poudre blanche qui contient 88 % de protéines.

30 La migration électrophorétique des protéines est identique à celle qu'elles avaient dans le lactosérum. Elles ne sont donc pas dénaturées.

On constate que la résine mise en oeuvre présente une capacité d'adsorption de 104 mg/g et que l'élution est pratiquement quantitative.

Exemple 2

35 On répète l'exemple 1, avec 500 ml du même lactosérum, au lieu de 200 ml.

40 Les solutions sortant de la colonne contiennent les matières grasses, le lactose et les sels minéraux présents dans la solution de départ, ainsi qu'une partie des protéines non fixées à cause de la saturation de la colonne.

Les protéines adsorbées sont éluées par 47 ml d'une solution d'ammoniaque N/10. Après concentration et séchage, on obtient 1,8 g d'une poudre blanche contenant 93 % de protéines non dénaturées.

La résine a une capacité d'adsorption à saturation de 167 mg/g.

Par comparaison avec l'exemple 1, on constate que l'on peut travailler à non saturation de la résine ou à saturation ; dans ce cas, les protéines non adsorbées peuvent être séparées par passage sur une autre colonne.

Exemple 3

Dans une colonne identique à celle de l'exemple 1 et contenant 10 g de la même résine lavée, on percole, à raison de 250 ml/h, 1 litre de lactosérum préalablement déprotéiné par ultrafiltration, dont le pH est de 5,3 et la teneur en protéines de 0,5 g/l. La résine est ensuite lavée par passage de 100 ml d'eau.

Les solutions sortant de la colonne contiennent le lactose et les sels minéraux, présents dans la solution de départ et ne contiennent plus de protéines. On obtient donc un perméat totalement déprotéiné, utilisable.

Les protéines adsorbées sur la résine sont éluées par percolation de 30 ml d'ammoniaque N/10. Après concentration sous vide et séchage, on obtient 0,55 g d'une poudre blanche, qui contient 90 % de protéines non dénaturées.

Exemple 4

Dans une colonne de 2,5 cm de diamètre, sont placés 10 g d'une résine échangeuse de cations constituée d'une silice ayant une granulométrie de 100 à 500 μ m, une surface spécifique de 30 m²/g, un diamètre poreux moyen de 1050 Å et un volume poreux de 1,02 ml/g, revêtue de 7 mg/m² d'un copolymère acide acrylique-diméthacrylate de diéthylèneglycol.

La résine contient des groupements fonctionnels -COOH et possède une capacité d'échange de 0,4 meq./g.

La résine est lavée par passage de 100 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N en une heure, puis de 200 ml d'eau en deux heures.

100 ml de lactosérum acide, dont le pH est de 4,9 et la teneur en protéines de 5,5 g/l, sont percolés dans la colonne en une heure, à température ambiante, puis la résine est lavée par passage de 100 ml d'eau distillée.

Les solutions sortant de la colonne contiennent les matières grasses, le lactose et les sels minéraux présents dans la solution de départ et ne contiennent plus de protéines.

Les protéines adsorbées sur la résine sont éluées par percolation de 35 ml d'une solution d'ammoniaque N/10. Après concentration sous vide et séchage par lyophilisation, on obtient 0,6 g d'une poudre blanche qui contient 92 % de protéines non dénaturées.

La capacité d'adsorption de la résine est de 55 mg/g.

REVENDEICATIONS

1° Procédé de separation des protéines du lactosérum, qui consiste à mettre en contact du lactosérum avec une résine échangeuse de cations formée d'un support minéral poreux ayant une granulométrie comprise entre 4 μ m et 5 mm, une surface spécifique de l'ordre de 5 à 150 m²/g, un diamètre de pores de 500 à 2500 Å, et un volume poreux de 0,4 à 2 ml/g, revêtu d'une quantité inférieure à 15 mg/m² d'un film de polymère réticulé contenant ou portant des groupements échangeurs de cations -SO₃H ou -COOH et possédant une capacité d'échange inférieure à 2 meq./g, à adsorber les protéines, puis à les éluer et est caractérisé en ce que le lactosérum mis en oeuvre est acide et en ce que toutes les protéines sont séparées.

2° Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le lactosérum est un sous-produit de la fabrication de fromages ou de la caséine, qui possède un pH inférieur à 5,5, une teneur en sels minéraux relativement élevée et une teneur en protéines comprise entre 5 et 7 grammes par litre.

3° Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le lactosérum est un perméat d'ultrafiltration qui possède un pH inférieur à 5,5, une teneur en matières grasses très faible et une teneur en protéines inférieure ou égale à 0,6 gramme par litre.

4° Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mise en contact du lactosérum et de la résine échangeuse de cations est effectuée à un pH inférieur à 5,5 et à une température comprise entre 0 et 60°C.

5° Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la quantité de résine échangeuse de cations à mettre en oeuvre est de 5 à 20 grammes par gramme de protéine à séparer.

6° Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les protéines adsorbées sont séparées de la résine échangeuse de cations par élution avec soit une solution de force ionique élevée, soit une solution de pH basique.

7° Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les protéines en solution obtenues, sont séchées par atomisation ou lyophilisation.